昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，October 2002，45（5）：693－695　　ISSN 0454-6296

不同保藏处理的昆虫标本 DNA 提取及其随机扩增多态 DNA 反应

张迎春，刘　波，郑哲民，李　力
（陕西师范大学生命科学学院，西安　710062）

摘要：实验利用 CTAB 法对柳二十斑叶甲 *Chrysomela vigintipunctata*（Scopoli）、异色瓢虫 *Harmonia axyridis* Pollas、七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* Linnaeus、小地老虎 *Agrotis ypsilon*（Rottemberg）、红蜻 *Crocothemis servilia* Drury、无齿稻蝗 *Oxya abentata* Willemse 和中华稻蝗 *Oxya chinensis*（Thunberg）等 7 种昆虫进行了基因组 DNA 提取。从自然干燥标本、烘干标本及酒精浸泡标本获得的 DNA 均可用于 RAPD-PCR 反应，且烘干标本、酒精浸泡标本提取效果优于自然干燥标本。这种提取方法简便易行，容易掌握，且耗资小于其它分子生物学方法。

关键词：DNA 提取；RAPD-PCR；昆虫；标本；分子系统学
中图分类号：Q969.4968　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）05-0693-03

DNA extraction and RAPD-PCR of insect specimens preserved with different methods

ZHANG Ying-Chun，LIU Bo，ZHENG Zhe-Min，LI Li（College of Life Science，Shaanxi Normal University，Xian 710062，China）

Abstract: Genomic DNA were extracted and amplified using the polymerase chain reaction and arbitrary primers from specimens of seven insect species: *Chrysomela vigintipunctata*（Scopoli）（Coleptera: Chrycomelidae），*Harmonia axyridis* Pollas and *Coccinella septempunctata* Linnaeus（Coleoptera: Coccinellidae），*Agrotis ypsilon*（Rottemberg）（Lepidoptera: Noctuidae），*Crocothemis servilia* Drury（Odonata: Libellulidae），and *Oxya abentata* Willemse and *O. chinensis*（Thunberg）（Orthoptera: Catantopidae）. Of the specimens assayed，some had been naturally dried，some oven-dried and the remainder had been preserved in alcohol. The results suggest that，with respect to DNA extraction，oven-dried specimens and those preserved in alchohol are better than naturally dried specimens. Extraction of DNA extraction using the CTAB method was easier，and more economical than other methods.

Key words: DNA extraction; RAPD-PCR; insect; specimen; molecular systematics

利用分子生物学技术从核酸水平对昆虫进行物种鉴别以及探讨物种的起源和进化，是现代生物系统学和生物进化学的研究热点之一，这类研究的关键步骤是获得物种的 DNA 或 RNA（Chapco *et al*.，1992；Roehrdanz and North，1992；Black *et al*.，1992；Dillon *et al*.，1996）。为了探讨一种适应范围广、效果好、操作简便易行的提取方法，我们利用 CTAB（十六烷基三甲基溴化胺）法，对分属于 4 目 5 科的不同类型昆虫标本，进行了 DNA 提取方法的探索研究，并将提取的 DNA 作为反应模板，进行了随机扩增多态 DNA 聚合酶链反应（RAPD-PCR）。旨在为今后广泛开展生物亲缘关系分析、基因组比较、遗传多态性和某些特定基因的标记等分子生物学研究，提供一定的基础。

1　材料与方法

1.1　研究种类和材料

研究种类包括下列 7 种昆虫：鞘翅目叶甲科柳二十斑叶甲 *Chrysomela vigintipunctata*（Scopoli）

基金项目：陕西省自然科学基金资助项目（97SM10）

第一作者简介：张迎春，女，1956 年 2 月生，河南偃师人，博士，副教授，研究方向为昆虫分子系统学，E-mail：yingchunzcn@yahoo.com.cn

收稿日期 Received：2001-06-05；接受日期 Accepted：2002-03-19

（Coleroptera: Chysomelidae）、瓢虫科异色瓢虫 *Harmonia axyridis* Pollas 和七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* Linnaeus（Coleroptera: Coccinelidae），鳞翅目夜蛾科小地老虎 *Agrotis ypsilon*（Rottemberg）（Lepidoptera: Noctuidae），蜻蜓目蜻科红蜻 *Crocothemis servilia* Drury（Odonata: Libelluidae），直翅目斑腿蝗科无齿稻蝗 *Oxya abentata* Willemse 和中华稻蝗 *Oxya chinensis*（Thunberg）（Orthoptera: Catantopidae）。

实验材料分别于1998～1999年采自陕西省的延安、华阴、宁陕、石泉。

1.2 方法

1.2.1 标本处理

酒精浸制标本：将野外采集的昆虫饥饿24 h以上，使其消化道内的物质充分消化，以防外源DNA干扰实验结果；浸入无水乙醇中12～24 h，置换无水乙醇，4℃冰箱中保存。烘干标本：将野外采集的昆虫饥饿24 h以上处死，置于标本盒中阴干约10～15天，于40～60℃烘箱内24 h，烘干后取出，干燥条件下保存。阴干标本：将野外采集昆虫饥饿24 h后，处死，置于标本盒中，自然条件下阴干保存，并注意防止霉变与虫蛀。

1.2.2 基因组提取

参照国外（Boycecy *et al.*，1989）的方法，部分步骤进行修改。将小型昆虫个体除去双翅，置于1.5 mL Eppendorf管中用塑料研杆粉碎。大型昆虫如蝗虫取其后足腿节肌肉部分，蜻蜓取其胸节部分，置入1.5 mL Eppendorf管中用塑料研杆粉碎。加入2×CTAB提取缓冲液［0.1 M Tris-HCl/0.02 M EDTA/1.4 M NaCl/0.2% β-巯基已醇/0.05 M CTAB（pH 8.3）］混匀。于65℃水浴中孵育45－60 min。常温下离心11 000 r/min 15，取上清液，加入等体积氯仿:异戊醇（24:1）抽提，离心11 000 r/min 10 min，取上清。反复抽提3次，再经异丙醇于冰冷条件下沉淀30 min（或过夜）。离心，11 000 r/min 15 min，70%酒精洗涤，干燥后加入适量三蒸无菌水溶解。提取实验中所用CTAB和β-巯基已醇购自Sigma公司，其余均为国产分析纯的药品试剂。

1.2.3 RAPD反应条件

每个反应系统体积为25 μL，内含10×buffer［500 mmol/L KCl/100 mmol Tris-HCl（pH 8.0）/1 mmol/L DTT/0.1% TritonX－100］2.5 μL，dNTP 0.15 mmol/L，$MgCl_2$ 1.5 mmol/L，引物1 μL，样品20 ng，Taq DNA聚合酶（上海生工产）2 U，无菌水17.2 μL。每个循环程序变性为94℃ 30 s，退火为37℃ 2 min，延伸72℃ 2 min，共进行45个循环，反应前在94℃预变性1 min 45 s，45个循环结束后，在72℃延伸10 min。反应在美国产Thermdyne Amlitron Ⅱ型基因扩增仪上进行。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳

配制1.2%的琼脂糖凝胶，内含溴化已锭（EB）0.5 μg/mL。电泳缓冲液为0.5XTBE（pH 8.0），电压100 V，2 h，紫外检测仪下观察、拍照。

2 结果与讨论

采用同一方法，对上述7种昆虫的不同标本类型进行了基因组DNA提取，结果经琼脂糖凝胶电泳检测，发现均可获得DNA分子（图1）。其中，烘干标本提取的DNA在核酸蛋白质分析仪（美国贝克曼公司产）上检测时的OD值平均为1.67，而酒精浸泡标本DNA的OD值平均为1.64，说明其提取量基本相同。而自然阴干标本若环境湿度大则易霉变，提取的DNA易发生降解。所以，烘干标本和酒精浸泡标本可以作为进行分子系统学研究首选的两种标本类型。这一结果对长距离、大范围的野外采集标本的DNA的获取将十分有利，也使分子系统学和分子进化学研究的广泛开展成为可能。

寻找通用引物是分子系统学研究的一个重要步骤，也是进行物种鉴别、比较的基础之一。实验用一条随机引物，在同一反应条件下，对不同目、科、种类，不同标本类型昆虫的DNA进行了扩增（图2），所获产物DNA多态性的结果表明了利用RAPD-PCR技术（Williams *et al.*，1990）寻找通用引物的可能性。这对不同昆虫在分子水平上的深入研究具有重要意义。

实验共使用75条随机引物对上述昆虫的DNA进行了扩增，产物的出带率为80%，这一结果与国外的研究相一致（Roehdanz and Flanders，1993）。但本方法在提取过程中不需要蛋白酶K等价格较昂贵的药品试剂，成本较底，且可在常温下（10℃～32℃）操作。提取过程仅需3～4 h，耗时短于其他提取方法，而且实验结果表明可适于上述四个目的昆虫，适应范围较广。显示了这种提取方法和技术在昆虫分子系统学、分子进化学研究领域的应用前景。

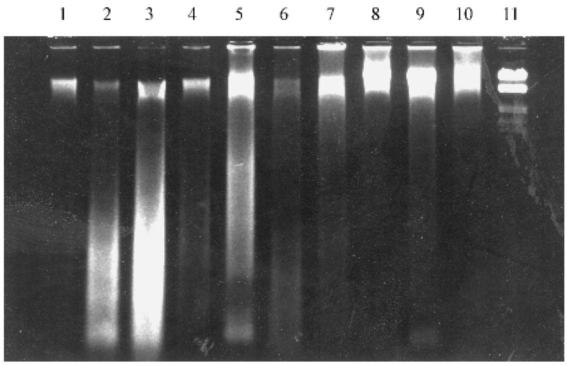

图 1　昆虫不同标本类型基因组 DNA 电泳图

Fig. 1　Electropherogram of genomic DNA extracted from insect specimens of different preservation types

烘干标本（oven-dried specimens）：1. 柳二十斑叶甲 *Chrysomela vigintipunctata*（Scopoli）；4. 小地老虎 *Agratis ypsilon*（Rottemberg）；5. 异色瓢虫 *Harmonia axyridis* Pollas；7. 中华稻蝗 *Oxya chinensis*（Thunberg）

自然干燥标本（naturally dried specimens）：2. 柳二十斑叶甲 *Chrysomela vigintipunctata*（Scopoli）；3. 小地老虎 *Agratis ypsilon*（Rottemberg）；6. 异色瓢虫 *Harmonia axyridis* Pollas

酒精浸泡标本（alcohol preserved specimens）：8. 红蜻 *Crocothemis servilia* Drury；9. 异色瓢虫 *Harmonia axyridis* Pollas；10. 中华稻蝗 *Oxya chinensis*（Thunberg）

11. DNA 分子量标准（DNA molecular weight marker）λDNA/*Eco* RⅠ + *Hin*dⅢ

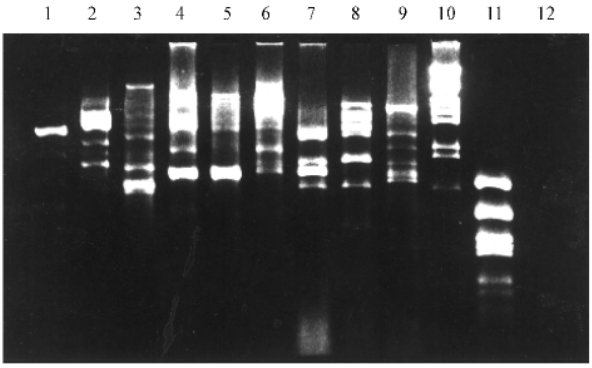

图 2　7 种昆虫 RAPD-PCR 扩增产物电泳图

Fig. 2　Electrophrogram of RAPD-PCR products in seven species of insects

A. 烘干标本（oven-dried specimens）：1. 柳二十斑叶甲 *Chrysomela vigintipunctata*（Scopoli）；2. 小地老虎 *Agrotis ypsilon*（Rottemberg）；3. 中华稻蝗 *Oxya chinensis*（rice grasshopper）；5. 无齿稻蝗 *Oxya abentata* Willemse；7. 异色瓢虫 *Harmonia axyridis* Pollas

B. 酒精浸泡标本（alcohol preserved specimens）：4，6. 无齿稻蝗 *Oxya abentata* Willemse；8. 七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* Linnaeus

C. 自然干燥标本（naturally dried specimens）：9. 红蜻 *Crocothemis servilia* Drury

10，11. DNA 分子量标准（DNA molecular weight marker）λDNA/ECORⅠ + HindⅢ，GEM + f（t）/HaeⅢ；12. 阴性对照 CK

参 考 文 献（References）

Black Ⅳ W C，Duteau N M，Puterka G J *et al.*，1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction（RAPD-PCR）to detect DNA polymorphisms in aphids（Homoptera：Aphididae）. *Bull. Entomol. Res.*，82：151　159.

Boyce T M，Zwick M E，Aquado C F，1989. Mitochondrial DNA in the pine weevil：size structure and heterophasmy. *Genetics*，123：825　836.

Chapco W，Ashton N W，Martel R K B *et al.*，1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshopper. *Genome*，35：569　574.

Dillon N，Austin A D，Bartowsky E，1996. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect. Molec. Biol.*，5（1）：21　24.

Roehrdanz R L，North D T，1992. Mitochondrial DNA restriction fragment variation and biosystematics of the boll weevil（*Anthonomus gradis*）. *Southwest Entomol*，17：101　108.

Roehdanz R L，Flanders R V，1993. Detection of DNA polymorphisms in predatory coccinellids using polymerase chain reaction and arbitrary primers（RAPD-PCR）. *Entomophaga*，38（4）：497　491.

Williams J G K，Kubelik A R，Livak K J *et al.*，1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*，18（22）：6 531　6 535.